

図とその説明

図1 両下肢に発症した扁平上皮癌を疑わせる深い難治性潰瘍 (a), 疣贅状の角化性腫瘍 (b, c)。

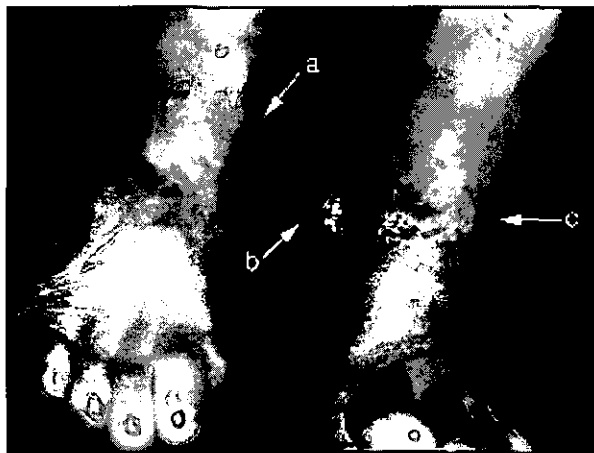


図2 図1, (a)から採取した病理組織。癌真珠を伴う高分化扁平上皮癌。



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

栄養障害型表皮水疱症患者由来角化細胞へのⅦ型コラーゲン遺伝子導入

分担研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 栄養障害型表皮水疱症に対する遺伝子治療の開発の目的で、Ⅶ型コラーゲン遺伝子を角化細胞に導入し、その蛋白発現を共焦点レーザー顕微鏡、ウェスタンブロット法にて検討した。共焦点レーザー顕微鏡所見では正常角化細胞、患者由来角化細胞ともに細胞質に蛋白の発現を認めた。ウェスタンブロット法では160kD付近のバンドが認められた。発現した蛋白は分解産物の可能性が示唆され、最適のプロモーターの選択が必要であると考えられた。

研究協力者

玉井克人：大阪大学医学部遺伝子治療学
菊池 康：弘前大学医学部皮膚科
白方裕司：愛媛大学医学部皮膚科

A. 研究目的

本研究の目的は栄養障害型先天性表皮水疱症に対する自己培養皮膚を用いた *ex vivo* 遺伝子治療の確立である。これまでの研究成果により、*ex vivo* 遺伝子治療には真皮成分と表皮成分を併せ持つ三次元培養皮膚が最適であることを明かにした。そこで、本年度は三次元培養皮膚へのⅦ型コラーゲン遺伝子導入の基礎実験として、角化細胞へⅦ型コラーゲン遺伝子を導入し、その蛋白発現について検討した。

B. 研究方法

正常ヒト皮膚由来角化細胞1種、栄養障害型表皮水疱症患者由来角化細胞2種は無血清培養法にて培養したものを使用した。研究協力者の玉井が作製したⅦ型コラーゲン発現ベクターをリポフェクション法（Gugene 6, Roche 社）を用いて角化細胞に導入した。

① チャンバースライド（Nunc 社）に角化細胞を播種し、無血清培養にて培養した。細胞密度が60-70%に達した時点で、

Ⅶ型コラーゲン遺伝子をリポフェクション法にて導入した。48時間後に細胞をメタノールで固定し、蛍光抗体法にて染色した。抗体はⅦ型コラーゲンのNC1領域を認識するLH7.2を用い、共焦点レーザー顕微鏡にて蛋白の発現を解析した。

② 10cm dish に角化細胞を播種し無血清培養にて培養、細胞密度が80%に達した時点でⅦ型コラーゲン遺伝子をリポフェクション法にて導入した。48時間後に蛋白をRIPA bufferにて回収し、ウェスタンブロット法にて解析した。抗体はLH7.2を用い、chemifluorescence法にて染色し、Fluoroimagerを用いて解析した。

C. 研究結果

Ⅶ型コラーゲン遺伝子を導入した正常角化細胞では蛋白の発現が蛍光抗体法にて確認でき、おもに細胞質に発現していた。（図1）。導入効率はおおむね30%であり、これは従来のFugene6を用いたリポフェクション法とほぼ同様の効率であった。一方栄養障害型表皮水疱症患者由来角化細胞においても蛋白の発現が認められ、その発現パターンは正常角化細胞と同様であった（図2）。ウェスタンブロット所見では160kD付近にバンドが認められ、290kD付近

にはバンドは認めなかった (図3)。

D. 考察

VII型コラーゲン遺伝子をリポフェクション法を用いて角化細胞に導入しその蛋白発現を検討した。蛍光抗体法の所見では細胞質に蛋白の発現が認められたが、ウェスタンブロット法では目的とする290kDの蛋白はみられず、160kD付近にバンドが認められた。この解釈としては、プロモーターが強すぎるため、分解された可能性が考えられる。もう一つの解釈としては、LH7.2で認識されるNC1領域は産生されているが、その後の領域において変異蛋白が産生されている可能性が考えられる。これらの可能性を解決するためには、①生理的なプロモーター (表皮特異的プロモーターなど) を使用する、②塩基配列をシーケンスすることにより、変異の有無をチェックする必要があると思われる次年度の課題である。

VII型コラーゲン遺伝子はサイズが大きく、導入効率のよいアデノウィルスベクターやレトロウィルスベクターには現時点では挿入が困難である。従って、昨年度までに開発した超音波を用いた方法、HVJ-liposome法、リポフェクション法が候補としてあげられる。今回の検討により、リポフェクション法においても導入効率は30%程度認められており、この導入効率でも治療可能か否かについては今後検討すべき課題である。すなわちVII型コラーゲンがどの程度産生されれば治療効果が得られるかについて検討する必要がある。これらのベクターによる遺伝子導入に際しては、生理的な発現が必要であり、発現が強すぎる場合かえってよくない場合もあり得ることが示唆された。従って、より最適なプロモーターの選択と導入法の組み合わせの検討が必要であると思われる。

E. 結論

栄養障害型表皮水疱症患者由来角化細胞

へ遺伝子を導入し、その発現を検討した。NC1領域は発現していると思われたが、全長は発現していないと思われ、cDNAの再チェックとプロモーターの選択が必要と思われる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成15年度)

論文発表

英語論文

1. Hashimoto K, Yasukawa M, Tohyama M: Human herpesvirus 6 and drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003, 3:255-60
2. Nanba D, Mammoto A, Hashimoto K, Higashiyama S: Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. *J Cell Biol* 2003, 163:489-502
3. Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M, Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi S, Kitakaze M, Hashimoto K, Raab G, Nanba D, Higashiyama S, Hori M, Klagsbrun M, Mekada E: Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:3221-6.
4. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hanakawa Y, Detmar M, Hashimoto K: Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for VEGF-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation. *J Biol Chem* 2003, 278:40026-31
5. Nakamura Y, Fukami K, Yu H,

- Takenaka K, Kataoka Y, Shirakata Y, Nishikawa SI, Hashimoto K, Yoshida N, Takenawa T: Phospholipase Cdelta(1) is required for skin stem cell lineage commitment. **EMBO J** 2003, 22:2981-2991.
6. Masaki T, Fukunaga A, Tohyama M, Koda Y, Okuda S, Maeda N, Kanda F, Yasukawa M, Hashimoto K, Horikawa T, Ueda M: Human herpes virus 6 encephalitis in allopurinol-induced hypersensitivity syndrome. **Acta Derm Venereol** 2003, 83:128-31
 7. Tsuda T, Tohyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K: Lack of evidence for TARC/CCL17 production by normal human keratinocytes in vitro. **J Dermatol Sci** 2003, 31:37-42
 8. Midorikawa K, Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Fujiwara T, Yamazaki K, Sayama K, Taubman MA, Kurihara H, Hashimoto K, Sugai M: Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. **Infect Immun** 2003, 71:3730-9
 9. Shibata R, Kai H, Seki Y, Kato S, Wada Y, Hanakawa Y, Hashimoto K, Yoshimura A, Imaizumi T: Inhibition of STAT3 prevents neointima formation by inhibiting proliferation and promoting apoptosis of neointimal smooth muscle cells. **Hum Gene Ther** 2003, 14:601-10
 10. Yamasaki K, Hanakawa Y, Tokumaru S, Shirakata Y, Sayama K, Hanada T, Yoshimura A, Hashimoto K: SOCS1/JAB and SOCS3/CIS3 negatively regulate the STATs signaling pathway in normal human epidermal keratinocytes. **J Invest Dermatol** 2003, 120:571-80.
 11. Yamasaki K, Toriu N, Hanakawa Y, Shirakata Y, Sayama K, Takayanagi A, Ohtsubo M, Gamou S, Shimizu N, Fujii M, Miyazono K, Hashimoto K: Keratinocyte growth inhibition by high-dose epidermal growth factor is mediated by transforming growth factor β autoinduction: A negative feedback mechanism for keratinocyte growth. **J Invest Dermatol** 2003, 120:1030-1037.
 12. Hamada K, Kohno S, Iwamoto M, Yokota H, Okada M, Tagawa M, Hirose S, Yamasaki K, Shirakata Y, Hashimoto K, Ito M: Identification of the Human IAI.3B Promoter Element and Its Use in the Construction of a Replication-selective Adenovirus for Ovarian Cancer Therapy. **Cancer Res** 2003, 63:2506-12.
 13. Yanai F, Ishii E, Kojima K, Hasegawa A, Azuma T, Hirose S, Suga N, Mitsudome A, Zaitzu M, Ishida Y, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K, Yasukawa M: Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4⁺ T lymphocytes: analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas-deficient target cells. **J Immunol** 2003,

- 170:2205-13.
14. Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, Sayama K, Murakami S, Hashimoto K: Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex. **J Dermatol** 2003, 30:135-40.
 15. Wada T, Shirakata Y, Takahashi H, Murakami S, Iizuka H, Suzuki H, Hashimoto K: A Japanese Case of Segmental Darier's Disease Caused by Mosaicism for the ATP2A2 Mutation **Br J Dermatol** 2003, 149:185-8.
 16. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hashimoto K: So-called biological dressing effects of cultured epidermal sheets are mediated by the production of EGF family, TGF- β and VEGF. **J Dermatol Sci** 2003, 32:209-15

日本語論文

1. 藤山幹子、橋本公二: drug-induced hypersensitivity syndromeとHHV-6 臨床免疫 40:219-21, 2003
2. 橋本公二: DIHS の経緯と診断基準 医学のあゆみ 205:951-4, 2003
3. 橋本公二: DIHS とはなにか アレルギー・免疫 10:811-5, 2003
4. 山崎研志、白方裕司、佐山浩二、橋本公二: 角化細胞の幹細胞 再生医学 40:218-225, 2003
5. 藤山幹子、橋本公二: 薬剤誘発性過敏症症候群 アレルギー科 15:381-6, 2003

学会発表

1. Yamasaki K, Dai X, Nanba D, Shiraishi K, Yahata Y, Tokumaru

- S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Higashiyama S, Hashimoto K: PLZF regulates and suppresses melanoma proliferation and tumor growth. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
2. Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M: In vitro keratinocyte dissociation assay to evaluate blister-inducing activity of pemphigus IgG autoantibodies. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
3. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Hashimoto K: Novel role of angiotensin II in fibroblasts: induction of fibroblast migration by angiotensin II via HB-EGF-mediated EGF receptor transactivation. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
4. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Higashiyama S, Hashimoto K: Keratinocyte-specific HB-EGF-deficient mice show marked retardation of skin wound healing. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
5. Nanba D, Shirakata Y, Nakanishi Y, Hieda Y, Ishiguro H, Higashiyama S, Hashimoto K: Epidermal hyperplasia and impaired morphogenesis of hair follicles in mice overexpressing a soluble form of heparin-binding EGF-like growth factor. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach

- May 2003, USA
6. Dai X, Yamasaki K, Yahata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K: All trans-retinoic acid induces production of IL-8 in human keratinocytes via increased phosphorylation of I κ B α in the NF κ B pathway. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 7. Tohyama M, Shirakata Y, Yamasaki K, Sayama K, Tsuda T, Tan E, Hashimoto K: production of MIP-1 α /CCL3 is mediated via toll-like receptor 3 in human keratinocytes. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 8. Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Dai X, Sugai M, Ichijo H, Hashimoto K: Epidermal differentiation regulates the production of innate antimicrobial peptides in the skin. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 9. Tokumaru S, Shirakata Y, Yamasaki K, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: EGF receptor transactivation by UV-irradiation is mediated via HB-EGF shedding in human keratinocytes. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 10. Hashimoto K: Drug induced hypersensitivity syndrome (DIHS). 13th Korea-Japan Joint Meeting of Dermatology, Daejeon Oct 2003, Korea
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

図1：正常角化細胞へのⅦ型コラーゲン遺伝子導入。Ⅶ型コラーゲンは細胞質に発現。

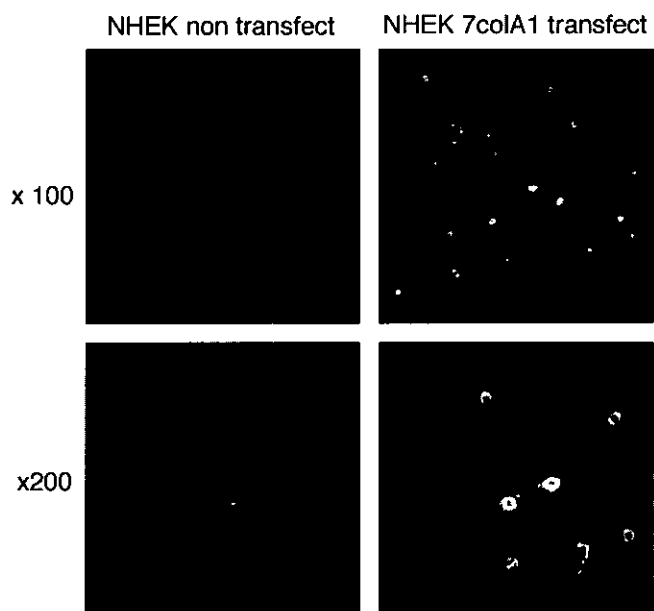


図2：RDEB患者由来角化細胞へのⅦ型コラーゲン遺伝子導入。Ⅶ型コラーゲンは細胞質に発現。

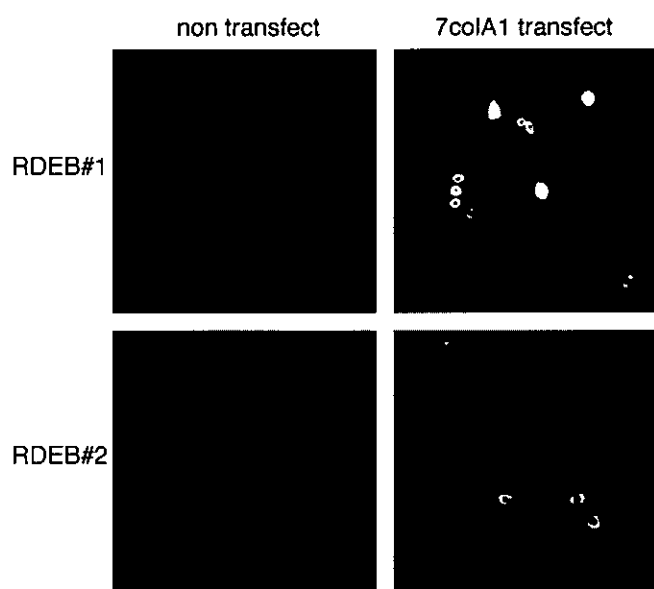
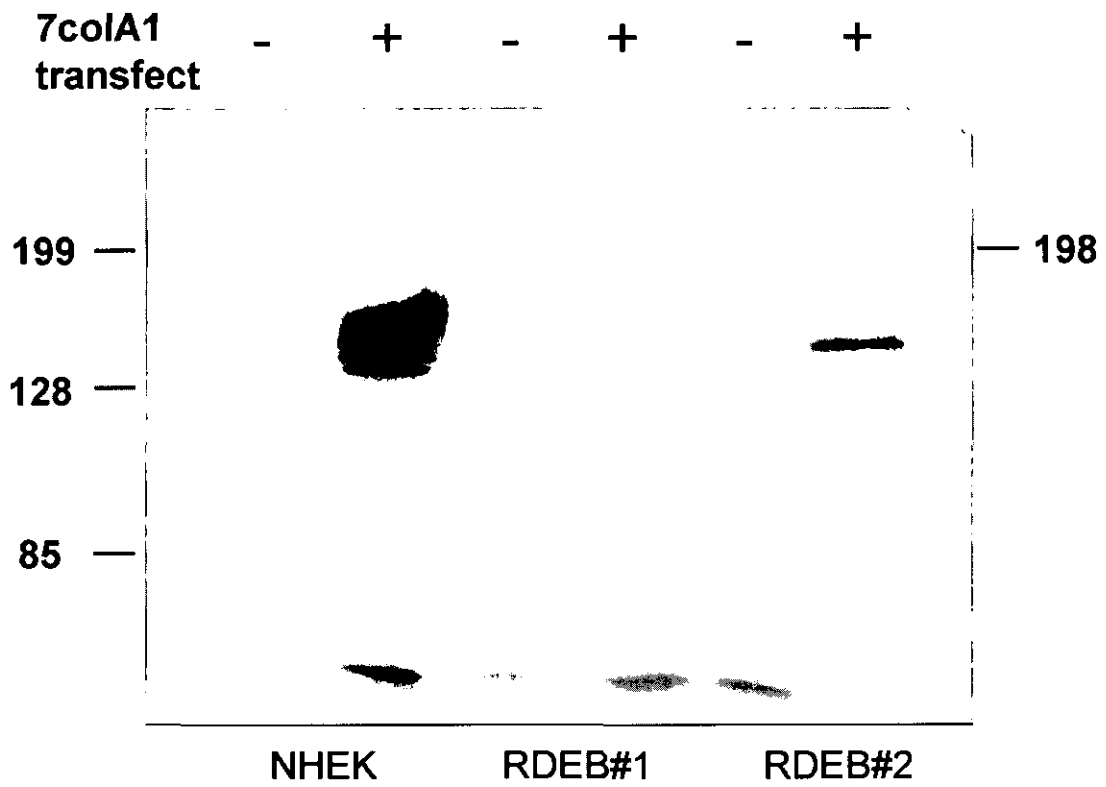


図3：ウェスタンブロット所見。160kD付近にバンドがみられる。



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

超音波造影法を用いた遺伝子導入による In vivo 遺伝子機能解析

分担研究者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 教授

研究要旨 遺伝子治療のためには安全で効率のよいベクターシステムばかりではなく、治療に適した遺伝子を選別する必要がある。そのためには生体組織での遺伝子機能を解析することが求められている。本研究においては我々が開発してきた超音波造影法を用いて、マウス胎仔皮膚への HB-EGF 遺伝子導入による皮膚組織の変化について解析した。さらに下肢血管の閉塞による皮膚潰瘍の治療効果を増強させる遺伝子の組み合わせについての評価を行ったので報告する。

A. 研究目的

難治性皮膚疾患の治療に有用な治療分子を選別するために、直接皮膚組織に及ぼす効果を評価する必要がある。そのためには毒性の低い、かつ効率の高い導入法が求められている。In vivo での遺伝子機能解析の有用性を示し、治療遺伝子を提唱することを目的として実験を行った。

B. 研究方法

マウス胎仔皮膚への遺伝子導入として、妊娠13-15日のマウス（50-60 g）を麻酔し、plasmid DNA 10 μ g/5 μ l sterilized water と 5 μ l の造影剤（optison; Mallinckrodt 社）の混合溶液を経子宮的に羊水中に microcapillary（GD-1.2, Narishige 社）で注入した。直後に、超音波発生装置 Ultax UX301（Celcom 社）を用いて 2Hz, 4.0W/cm², 10sec の条件で子宮外から超音波処理した。

マウス骨格筋への遺伝子導入のためには前頸骨筋に 200 μ g の naked plasmid DNA を optison と混合して注入し、直後に同様の機器で 1 MHz, 2.5W/cm² で 1-10 分間照射した。

C. 研究結果

1) Heparin-binding EGF-like growth

factor (HB-EGF) 遺伝子の膜貫通ドメインを欠失した変異体 HB Δ TM と GFP 遺伝子とに融合遺伝子をマウス胎仔皮膚に超音波造影法を用いて導入し、GFP 遺伝子発現の見られる部位での皮膚組織の変化を調べたところ、keratin で染色される表皮の著明な過形成が認められた。しかし s wild type HB-EGF ではこのような変化は見られなかった。この過形成は HB-EGF の mitogenic activity を阻害する CRM197 を投与すると抑制された。

2) 血管新生作用のある VEGF や HGF の naked plasmid を血管閉塞部位の骨格筋に導入すると血管新生が誘発され下肢虚血を改善できるが、遺伝子導入効果は超音波造影法によって 10 倍増強された。この方法により血管新生遺伝子と相乗的效果を発揮できる遺伝子の検索のため、prostacyclin synthase gene を併用したところ、VEGF、HGF の両ケースにおいて、レーザードップラー血流計による血流量が 1.5 倍増強され、組織のアルカリホスファターゼ染色による血管数も 1.5 倍増加が認められた。

D. 考察

1) HB-EGF の細胞外ドメインが表皮細

胞の増殖促進効果を持ち、HB-EGFの膜貫通ドメイン欠失変異体においてはパラクライン的に分泌されたHB-EGF Δ TMが効果を増強したと考えられる。

- 2) 糖尿病などで見られる著明な皮膚潰瘍は血管閉塞による場合が多く、血管新生遺伝子治療は難治潰瘍の治療に有効であろうと期待される。今回見いだされたprostacyclin synthase 遺伝子による相乗効果は血管拡張による血流量の増加が血管新生にも効果的であることを示すとともに、さらに有効な治療法を提唱することにもつながる。

E. 結論

超音波造影法による遺伝子導入は遺伝子治療法としてはさらに改善するべきところがあるが、In vivoでの遺伝子機能解析には非常に有効で、マウス胎仔から成育マウスに至るまで、また標的臓器にしぼって機能を解析することも可能であり、今後治療遺伝子の検索や評価に汎用されることが期待される。

F. 健康危険情報

特に有害な薬剤や作業は含まれなかった。

G. 研究発表 (平成15年度)

1. 論文発表

- 1) Koike, H., Morishita, R., Iguchi, S., Aoki, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., Yokoyama, C., Tanabe, T., Ogihara, T., and Kaneda, Y.: Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by cotransfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene. *The FASEB J.*, 17, 779-781, 2003.
- 2) Kaneda, Y. and Tamai, K.: Current status and future prospects of gene therapy technologies toward

the treatment of intractable skin diseases. *Arch. Dermatol. Res.* 295, S63-66, 2003.

- 3) Hiraoka, K., Koike, H., Yamamoto, S., Tomita, N., Yokoyama, C., Tanabe, T., Aikou, T., Ogihara, T., Kaneda, Y., and Morishita, R.: Enhanced therapeutic angiogenesis by cotransfection of prostacyclin synthase gene or optimization of intramuscular injection of naked plasmid DNA. *Circulation* 108, 2689-2696, 2003.
- 4) Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., Endoh, M., Kaneda, Y., Takagi, S., Itami, S., Takeda, N., Yamada, G., and Mekada, E.: Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J. Cell Biol.* 163, 469-475, 2003.

2. 学会発表

金田安史. 第102回日本皮膚科学会総会. 教育講演“遺伝子治療の現状と将来展望”
平成15年5月23日 浦安

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録 (予定)
- 1) 所望の機能的性質を有する核酸の単離方法及びそのためのキット (発明者: 金田安史、西川智之) (出願人: 金田安史、西川智之、ジェノミディア株式会社) 2003年11月20日出願 PCT/JP03/14857

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

栄養障害型表皮水疱症に対する遺伝子治療法開発

研究協力者 玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 助教授

研究要旨 栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療のための基礎研究を行った。平成15年度の研究内容は、1) 水疱部皮膚への遺伝子導入方法の開発、2) 治療用発現ベクターの安全性を向上させるプロモーター開発をテーマに研究を行った。

共同研究者

山崎尊彦、大鶴聰、遠藤誠之、金田安史
大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学
知野剛直、北島康雄
岐阜大学医学部皮膚科

A. 研究目的

栄養障害型表皮水疱症患者に対する遺伝子治療の際には、皮膚病変の性質に合わせた遺伝子導入法を開発する必要がある。われわれは、1) 水疱形成部位、2) 非水疱形成部位、3) 潰瘍形成部位、の3種類の異なる性質の皮膚に対し、それぞれ効率よく遺伝子導入する方法論の開発を進めている。平成15年度は、特に水疱形成部位に対する遺伝子導入法の確立を目標に研究を行った。また、栄養障害型表皮水疱症の欠損遺伝子であるⅦ型コラーゲン遺伝子を安全に生体内に導入するためには、Ⅶ型コラーゲン遺伝子プロモーターを用いて生理的発現部位に限定したⅦ型コラーゲンの発現を誘導することが望ましい。今年度は、約4000塩基対のヒトⅦ型コラーゲン遺伝子プロモーターをクローニングし、皮膚基底膜領域に特異的なⅦ型コラーゲン発現ベクターの開発を進めた。

B. 研究方法

1) 水疱部皮膚への遺伝子導入方法の確立：
真空吸引装置を弘前ヘアレスラット背部皮膚に装着し、陰圧をかけて吸引水疱を

形成した。水疱内容液を除去後、GFP遺伝子発現プラスミドDNA/10%超音波造影剤溶液を水疱内に注入し、治療用超音波発生装置を用いて種々の超音波を水疱部に照射、24時間後に同部位表皮におけるGFPの発現を観察した。

2) COL7A1プロモーターのクローニング：
COL7A1プロモーター領域の塩基配列をデータベース上で検索し、約4000塩基対のプロモーター領域をPCRにて増幅した。この領域をルシフェラーゼ遺伝子およびⅦ型コラーゲンcDNAの上流に接続した。

C. 研究結果

1) 水疱部皮膚への遺伝子導入方法の確立：
ヘアレスラット背部皮膚に作成した吸引水疱内にGFP発現プラスミド単独、GFP発現プラスミド/10%造影剤溶液を注入し、超音波エネルギー照射24時間後にGFPの発現を検討した。その結果、GFP発現プラスミド単独に比べ、造影剤との併用によって水疱部位の表皮細胞におけるGFPの強い発現が得られることを確認した。

2) COL7A1プロモーターのクローニング：
データベースから得たCOL7A1プロモーター配列を基にして、転写開始部位上流4000塩基、3000塩基、2000塩基、および1000塩基のヒトDNAをPCRによりクローニングした。それぞれの

DNA断片を、ルシフェラーゼ遺伝子に接続したCOL7A1/ルシフェラーゼ・レポータープラスミドを作成し、培養ヒト表皮細胞中に導入してルシフェラーゼ活性を確認、それぞれのDNA断片がCOL7A1プロモーターとして機能することを確認した。

D. 考察

栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療を考えた際に、治療の必要な皮膚病変は大きく3種類に分類される。即ち、新鮮水疱部、非水疱部、潰瘍形成部である。このうち、潰瘍形成部に対する治療は、愛媛大学の橋本、白方らが培養3次元皮膚シート移植を行い、一定の成果を上げている。さらにこの培養皮膚シートにⅦ型コラーゲン遺伝子を組み込むことにより、恒常的にⅦ型コラーゲンを発現する皮膚の形成が可能になると考えられる。また、われわれは、昨年度の研究として、非水疱部皮膚への遺伝子導入法として、ケミカルピーリングと超音波エネルギーを組み合わせることにより、生体皮膚へ直接プラスミド遺伝子を導入する新たな方法論を開発し報告した。平成15年度の研究では、超音波および造影剤を用い、水疱部皮膚に対する低侵襲性遺伝子導入法を開発した。造影剤は、超音波により破裂する際のエネルギーにより近接する細胞表面に微小孔をあけ、同時に発生するジェット流により細胞表面近傍のDNA溶液を細胞内に流入する。本研究では、吸引水疱内にDNA/造影剤溶液を注入して超音波を照射することにより、水疱蓋及びその近傍の微小剥離表皮内に遺伝子導入が可能であることを明らかにした。この方法を応用することにより、栄養障害型表皮水疱症の水疱部表皮細胞内にⅦ型コラーゲン発現ベクターを導入する遺伝子治療が可能になると考えられる。また、今年度の研究として、われわれは、COL7A1プロモーターのクローニングを行った。4000塩基対のDNA

はCOL7A1プロモーター領域全体をカバーするため、このプロモーターを用いてⅦ型コラーゲンcDNAを発現させることにより、より生理的に近い状態で遺伝子治療が可能になると思われる。

E. 結論

水疱部皮膚への遺伝子導入法を開発するとともに、COL7A1プロモーターをクローニングした。今後、これらの遺伝子導入法の有効性、安全性を検討し、将来の臨床応用を目標としたい。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表 (平成15年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Oshima K, Shimamura M, Mizuno S, Tamai K, Doi K, Morishita R, Toshikazu Nakamura T, Kubo T, and Kaneda Y : Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats. FASEB J in press
2. Umegaki N, Moritsugu R, Katoh S, Harada K, Nakano H, Tamai K, K, Hnanada, Tanaka M : Photodynamic therapy may be useful to debulk cutaneous lymphoma proir to radiotherapy. Clin Exp Dermatol in press
3. Tamai K, Hashimoto I, Hanada K, Ikeda S, Imamura S, Ogawa H : Jpapanese guidelines for diagnosis and treatment of junctional and dystrophic epidermolysis bullosa. Arch Dermatol Res. 2003. 2003; 295:24-28.

4. Kaneda Y and Tamai K : Current status and future prospects of gene therapy technologies toward the treatment of intractable skin diseases. Arch Dermatol Res. 2003; 295:63-66.
5. Matsuzaki Y, Tamai K, Kon A, Sawamura D, Uitto J and Hashimoto M: Keratinocyte responsive element 3 (KRE3): Analysis of a keratinocyte-specific regulatory sequence in the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG1) gene promoter. J Invest Dermatol, 120:308-12, 2003
6. Matsuki A, Yamamoto S, Nakagami H, Aoki M, Tamai K, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y, and Morishita R: No influence of

tumor growth by intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid DNA: Safety evaluation of therapeutic angiogenesis gene therapy in mice. Biochem Biophys Res Commun, 315:59-65, 2004

日本語論文

1. 玉井克人. 先天性表皮水疱症. 今日の小児疾患治療指針. 第13版 2003, p.576
2. 玉井克人. 先天性表皮水疱症を治す、難治性皮膚疾患を治すスキル、皮膚診療プラクティス 15、2003, p.238

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
無し。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

遊走性環状紅斑随伴性単純型先天性表皮水疱症の発症機序の分子医学的解析

研究協力者 市來善郎 岐阜大学医学部免疫アレルギー内分沁講座
皮膚病態学 講師

研究要旨 我々は、これまでに遊走性環状紅斑随伴性単純型先天性表皮水疱症 2 例について、ケラチン 5 (K 5) 遺伝子変異を検索し exon9 にヘテロの 1649 delG の欠失変異を見出し報告してきた。今回新たに経験した 1 例でも、同一の変異を確認するとともに、さらにフレームシフト、読み過ごし変異によって延長したケラチン 5 尾部の変異蛋白の存在を検討した。すなわち延長したケラチン 5 の C 末の 12 個のポリペプチドに対するポリクローナル抗体 (NT240) を用いて、患者皮膚に変異蛋白が存在することを免疫ブロッティングおよび免疫組織染色で確認した。本症において、ケラチン 5 尾部の変異と環状紅斑という特異な臨床像の関係を明らかにすることが、ケラチン分子の非 α ヘリックス領域の機能の解明につながると期待される。このことはケラチン分子変異による角化症や表皮水疱症全般の病態解明に大きく貢献すると考えられる。

共同研究者

戸崎裕子

岐阜大学医学部皮膚病態学

北島康雄

岐阜大学医学部皮膚病態学・教授

永井美貴

岐阜県立岐阜病院皮膚科

Soo-Chan Kim

Junsu Park

Cutaneous Biology Research Institute,
Brain Korea 21 Project for Medical
Science, Yonsei University College of
Medicine, Seoul, Korea

A. 研究目的

単純型先天性表皮水疱症 (EBS) は、表皮基底細胞に発現するケラチン (K 5、K14) の遺伝子異常によりケラチン中間径線維構築異常をきたすことで基底細胞に崩壊が生じ、臨床的には機械的外力により水疱を生ずる常染色体優性の遺伝性疾患である。Coulombe による Dowling-Meara 型の K14 点突然変異を端緒に、多くの EBS 患

者においてケラチン遺伝子の連鎖が解析され、特定の領域の点突然変異と EBS の表現型との関係が明らかになった。すなわちケラチン分子中央の α ヘリックス構造の両端に位置する分子種間によく保存された 20 アミノ酸の変異が重症の EBS (Dowling-Meara 型) に、また α ヘリックス構造をつなぐリンカーのアミノ酸異常が軽症の EBS (Köbner 型) に見い出され、 α ヘリックス構造がケラチン線維構築に重要であることが示された。しかし症例が蓄積されるにつれて同じ部位でも置換されるアミノ酸の種類によって表現型が異なったり、常染色体劣性の遺伝形式を示す症例、またケラチン分子の頭部に変異を認め、下腹部、腋窩、四肢などに斑状の色素斑を生ずる mottled 型などが報告されるようになり遺伝子型と表現型の関係は混沌としてきた。最近、我々は緊満性の水疱を辺縁に伴い遊走性または環状に拡大する紅斑という特異な臨床を呈した EBS 2 例について、KRT 5 の尾部に遺伝子変異を認めたため、遊走性環状紅斑随伴性単純型先天性表皮水疱症

として報告した。今回このEBS 2例に新たな1例を加えた計3例につき、変異ケラチン蛋白の発現を免疫組織学的に検討した。本症における genotype, phenotype の解析はケラチン病、すなわち先天性魚鱗癬様紅皮症、単純型先天性表皮水疱症の発症機序や病態解明のモデルになりうると期待される。

B. 研究方法

症例：今回検討した EBS 3 例の臨床所見の概略は以下の通りである。症例 1：2 才女児。出生直後より四肢に水疱を繰り返して生じるため岐阜大学皮膚科を受診した。家族に同症はない。初診時、足、腋窩および顎に、緊満性の水疱を辺縁に伴い遊走性または環状に拡大する紅斑を認めた。組織では表皮基底細胞内に裂隙を認め、電顕では有棘細胞においてデスモゾーム、ケラチン線維の減少および棘融解を認めた。症例 2：1 才女児。出生直後より四肢に水疱を生じ再発、寛解を繰り返すため韓国 Yonsei University を受診した。大腿に緊満性の水疱を辺縁に伴い環状に拡大する紅斑を認めた。家族歴、母、叔父、叔母、祖父および従兄弟計 5 名に同症あるがいずれも成長とともに水疱は軽快し色素沈着を残している。組織所見は症例 1 と同様であった。症例 3：0 歳女児。症例 1 の妹。出生時に、両下肢広範囲にびらんを認めたため、出生当日岐阜大学皮膚科を受診した。受診時、両下腿から足に一見皮膚欠損を思わせるようなびらんと、四肢および耳に散在する小水疱を認めた。その後びらんは徐々に上皮化し生後 2 ヶ月で完全に上皮化した。生後 6 ヶ月頃から四肢に散在性の遊走性紅斑を生じ次第に融合し環状紅斑となり、さらに中央に色素沈着を残しながら拡大した (図 1)。組織所見、免疫組織所見は症例 1 と同様であった。3 症例につき、患者末梢血から genomic DNA を分離し KRT5, KRT14 遺伝子の各エクソンを PCR

で増幅し、自動シーケンサー (ALOKA, Tokyo) でシーケンスしたところ KRT14 には異常を認めなかったが、KRT5 では exon 9 にヘテロの欠失変異 1649delG を認めた。

免疫ブロッティングおよび免疫組織学的検討：患者水疱蓋または凍結切片から蛋白を抽出し、ポリアクリルアミドゲルで泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーし後述の抗体を用いて免疫ブロッティングを行なった。また患者皮膚の凍結切片を用いて、同様の抗体で染色した。KRT5 の 1649delG 変異は、フレームシフトおよび読み過ぎし変異を起こし K5 の V2 ドメイン以下に正常より 35 個長い変異アミノ酸鎖を生じていると考えられたので、延長した K5 の C 末のポリペプチド (CSSHVL-SFSGE) をウサギに免疫しポリクローナル抗体 (NT240) を作成、アフィニティカラムで精製し使用した。コントロールとして抗ケラチン 5 抗体 (C50, Lab Vision, Fremont, CA, USA)、抗ケラチン 5 抗体 (RCK102, Sanbio, Uden, NL)、抗ケラチン 14 抗体 (LL002, Lab Vision, Fremont, CA, USA) を使用した。

C. 研究結果

免疫ブロッティング：抗 K5 抗体 (C50)、抗 K14 抗体 (LL002) は患者皮膚、正常皮膚ともに約 50KD のバンドを認めた。抗変異 K5 抗体 (NT240) では患者皮膚抽出蛋白に約 50KD のバンドを認めたが、培養正常皮膚ケラチノサイト抽出蛋白にはバンドを認めなかった。

免疫組織染色：

症例 3 より得られた患者皮膚の表皮基底層から有棘層下層の細胞質に抗変異 K5 抗体 (NT240) で明らかな陽性所見を、顆粒層直上に淡い陽性所見を認めた。正常皮膚では基底層から有棘層に陽性所見を認めなかったが顆粒層直上に陽性所見を認めた。なお、患者皮膚および正常皮膚で認め

られたいずれの陽性所見も、抗体を作成した際に使用したペプチドで吸収された。(図3)

D. 考察

我々はこれまでに遊走性環状紅斑随伴性単純型先天性表皮水疱症計3例を経験した。遺伝子変異の検索では、この3例はいずれもKRT5のexon9に欠失変異1649delGを認めた。この変異はK5蛋白の尾部V2ドメイン以下に35個長いアミノ酸鎖を生ずる可能性が示唆された。そこで、このアミノ酸鎖C末を認識する抗体(NT240)を新たに作成し、患者皮膚で免疫組織学的に検討したところ、変異ケラチン蛋白の発現が確認された。

また正常皮膚でも顆粒層直上においてNT240陽性所見を認めたことについては、抗体作成に用いたペプチドで吸収されたことから特異性があると考えられるが、その解釈については今後詳しく検討する予定である。

EBSは皮疹の分布や電顕所見などから、主としてWeber-Cockayne型、Köbner型、Dowling-Meara型の3型に分類されてきた。さらにその変異部位も、最も重症型のDM型では α ヘリックス構造の両端の保存された領域に集中し、軽症のWC型では α ヘリックス構造の1B, 2Aをつなぐlinkerに多く見られるなどgenotype-phenotypeの関係も明らかにされつつある。しかし自験例に認められたK5のC末に近い変動領域であるV2の変異は、我々の3例と、最近Sprecherらにより報告された1例のみである。後者においてその臨床像の詳しい記載がないため自験例に見られた遠心性紅斑の有無については不明である。自験例がケラチンフィラメント構築に関係する α ヘリックスの変異ではなく、尾部に延長を伴う変異を認めたことと、緊満性の水疱を辺縁に伴い遊走性または環状に拡大する紅斑とその内側に色素沈着を来す

というこれまでに報告のない極めて特異な臨床像とを関係づけると極めて興味深い。K5分子の同じ非 α ヘリックス構造領域である頭部のH1ドメインに変異を認めるmottled pigmentation typeでも小斑状の色素沈着を示す点は、紅斑移動後に色素沈着を残している自験例と共通しており、この点にも注目したい。

本症例の病態を解明することが、ケラチン分子の非 α ヘリックス構造領域の機能を明らかにし、さらにケラチン病発症機序の解明につながる可能性を示唆している。

E. 結論

緊満性の水疱を辺縁に伴い遊走性または環状に拡大する紅斑という特異な臨床を呈した単純型先天性表皮水疱症(EBS)3例について、ケラチン5のexon9にヘテロの1649delGの欠失変異を認めたこと、さらにこの変異によりフレームシフトおよび読み過ぎし変異を起こしK5のV2ドメイン以下に正常より35個長い変異ケラチン5が患者表皮に発現していることが確認された。このことはケラチン分子変異による角化症や表皮水疱症全般の病態解明に大きく貢献すると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表(平成15年度)

1. 論文発表

1. Li-Hong Gu, Soo-Chan Kim, Yoshiro Ichiki, Junsu Park, Miki Nagai, Yasuo Kitajima: A Unusual frameshift and delayed termination codon mutation in keratin 5 cause a novel type of Epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema. *J Invest Dermatol* 121:482-5, 2003.
2. M. Kamiya, Y. Ichiki, H. Kamiya,

- A. Yamamoto, Y. Kitajima: Detection of nonmelanoma skin cancer micrometastases in lymph nodes by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction for keratin 19 mRNA. Br J Dermatol 149:998-1005, 2003.
3. Izumi T, Ichiki Y, Esaki C, Kitajima Y: Monitoring of ELISA for anti-BP180 Antibodies: Clinical and therapeutic analysis of steroid

treated patients with bullous pemphigoid. J Dermatol, in press.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図とその説明

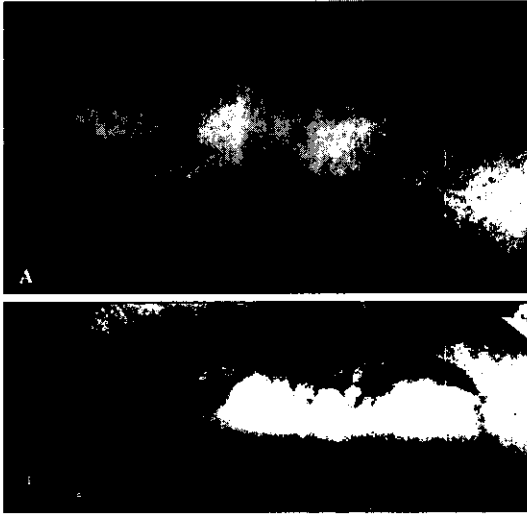


図1：症例3臨床像。生後6ヵ月頃から四肢に蛇行状紅斑を認め(A)、生後8ヵ月頃には融合し遊走性環状紅斑となった。紅斑の内側には色素沈着を認める(B)。

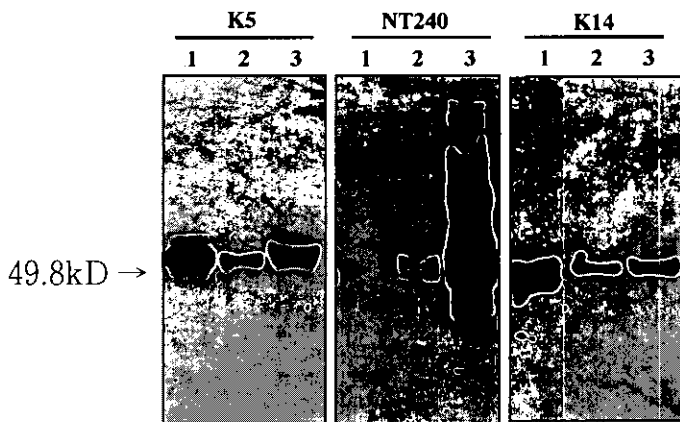


図2：免疫ブロティング。正常ヒト皮膚培養ケラチノサイト（1）はK5、K14で約50KDのバンドを認めるが、NT240では陰性である。一方患者皮膚水疱蓋（2：症例1、3：症例3）はK5、K14、NT240いずれにおいても約50KDのバンドを認める。

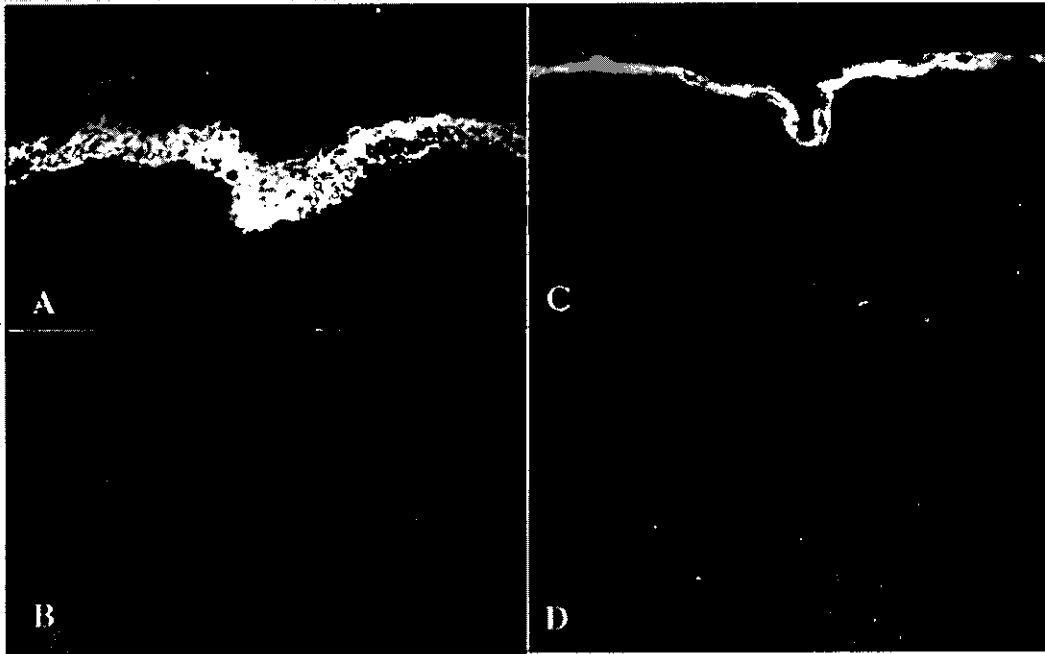


図3：NT240による免疫組織染色所見

患者皮膚（A）では基底層から有棘層下層に明瞭な陽性所見と顆粒層直上に淡い陽性所見を認め、いずれもペプチドで吸収される（B）。正常皮膚（C）では顆粒層直上に陽性所見認め、ペプチドで吸収される（D）。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症及び参考疾患の全国疫学調査

研究協力者 黒沢美智子 順天堂大学医学部衛生学 助手

研究要旨 全国の多施設を対象に患者数の推定と2次調査によって得られた臨床所見の結果から臨床疫学像を明らかにする事を目的とする。水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の診断基準が作成され、特定疾患の疫学に関する研究班と共同で「全国疫学調査マニュアル」に基づいて実施した。対象は2002年1年間の受療患者とし、全国の病院から病床規模別に層化無作為抽出した皮膚科計802科に2003年1月に患者数推計のための一次調査を実施した。参考疾患として、非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症(NBCIE)、葉状魚鱗癬(LI)、家族性天疱瘡の一次調査も合わせて実施した。参考疾患は二次調査の対象とせず、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症患者ありと回答のあった施設を二次調査対象とした。二次調査は主任研究者所属施設の倫理審査の承認を得て実施した。一次調査の返送数は507科、回収率は63.2%であった。回収された二次調査票28例から対象期間外の不適格例を除き、2002年1年間に水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症により全国の病院を受療した患者数は63人(95%信頼区間41-86人)と推計された。

共同研究者
池田 志孝
順天堂大学医学部皮膚科助教授
玉腰暁子
名古屋大学大学院医学研究科健康社会医学
予防医学/医学推計・判断学助教授
川村 孝
京都大学保健管理センター教授
稲葉 裕
順天堂大学医学部衛生学教授
北島康雄
岐阜大学医学部皮膚科教授
松葉 剛
順天堂大学医学部衛生学助手

A. 研究目的

全国の多施設を対象に水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の患者数の推計と二次調査によって得られた臨床所見の結果から臨床疫学像を明らかにすることを目的とする。参考疾患として非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症(NBCIE)、葉状魚鱗癬(LI)、家族性天

瘡の患者数についても調査する。

B. 研究方法

本調査は特定疾患の疫学に関する研究班(主任研究者：稲葉 裕)と共同で「難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル」¹⁾に基づいて実施された。

今回の調査にあたってはまず水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の診断基準が作成された。対象は2002年1年間の受療患者とし、2003年1月に患者数推計のための一次調査を実施した。一次調査では調査依頼状、診断基準、返信用ハガキを送付した。

前出のマニュアルに添って全国の病院から病床規模別に層化無作為抽出した皮膚科は計802科である。

一次調査で水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症患者なしの回答があった施設には礼状を送付し、患者ありと回答のあった施設を二次調査(資料1-3)対象とした。2月末日までに一次調査未回収の施設に督促状を送